

**Aromás szénhidrogének lebontásában résztvevő  
mikrobaközösségek vizsgálata a funkciógének alapján**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

*Táncsics András*



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Elméleti és evolúcióbíológia program

A Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Szathmáry Eörs

Témavezető: Dr. Márialigeti Károly, tanszékvezető egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Mikrobiológiai  
Tanszék

Budapest, 2009

## BEVEZETÉS

A kőolajnak, illetve származékainak mikrobiális lebontását, szén és energia forrásként való hasznosítását már a múlt század elején felismerték. Számos gombát és baktériumot fedeztek fel már ekkor, amelyek képesek voltak paraffinon növekedni. 1946-ban Claude E. ZoBell volt az első, aki a szénhidrogének mikrobiális lebontásáról addig összegyűlt ismereteket összefoglalta és rávilágított arra, hogy az ebben résztvevő mikroszervezetek széles körben elterjedtek és megtalálhatóak a környezetben. Rávilágított arra is, hogy a szénhidrogének lebontása nagyban függ azok kémiai tulajdonságaitól, illetve már ekkor leírták, hogy milyen környezeti feltételek szükségesek e folyamathoz.

A motorizáció és egyéb kőolaj alapú iparok térhódítása miatt az ember egyre újabb és újabb területeken kezdte el a kőolajkészletek kitermelését, a sekély kontinentális talapzatoktól a sarkvidékekig. Ennek köszönhetően jelentős mennyiségű kőolaj került és kerül napjainkban is környezetünkbe. Mindezek hatására nőtt meg a kutatók érdeklődése a mikrobiális szénhidrogén-lebontás iránt a múlt század második felében. Azóta számos szénhidrogén vegyület anyagcsere útvonalát sikerült feltérképezni, enzimek szerepét tisztázni e folyamatokban, és folyamatosan bővül azon ismert baktérium- és mikroszkopikus gombafajok száma, amelyek képesek e vegyületek hasznosítására.

Joggal merül fel a kérdés, hogy miért van szükség arra, hogy e mikroszervezeteket és az általuk képviselt folyamatokat tovább kutassuk, jobban megértsük. A létező baktériumfajoknak eddig mindössze csak töredékét sikerült kitenyészteni és leírni, így a fennmaradó, még ki nem tenyésztett fajok közösségben betöltött szerepe ismeretlen. A szénhidrogének lebontásában résztvevő mikroba közösségekben is számos olyan baktériumot lehet kimutatni a mai modern molekuláris módszerekkel, amelyek a tudomány számára ismeretlenek, így a közösségben betöltött szerepükről, anyagcsere folyamataikról nem rendelkezünk ismeretekkel. Ahhoz, hogy a kőolajjal, illetve annak származékaival szennyezett vizek és talajok mikrobiális kármentesítéséhez minél hatékonyabb technikákat fejleszthessünk, elengedhetetlenül fontos, hogy nyomon tudjuk követni a közösségben lejátszódó folyamatokat, az anyagcsere diverzitás változását. Munkám során az aromás szénhidrogének lebontásában fontos szerepet játszó funkciógének kimutatására, illetve monitorozására tettem kísérletet, annak érdekében, hogy ezáltal pontosabb képet kapjunk az aromás szénhidrogének lebontásában résztvevő mikroba közösségekben lejátszódó folyamatokról.

## CÉLKITŰZÉSEK

A szennyezett területekről vett talaj, illetve talajvízmintákból ma még elsősorban a 16S rRNS gének kimutatása és vizsgálata alapján próbálják megismerni a területen jelen lévő, aktív mikroba közösséget annak érdekében, hogy a talajban vagy a talajvízben lejátszódó folyamatokat megérthessék, és kiválaszthassák a leginkább megfelelő bioremediációs eljárást. Gyakran előfordul azonban, hogy ezen ismeretek megszerzése után sem teljesen világos, hogy mely baktériumok vesznek részt ténylegesen az adott szennyező anyag lebontásában, illetve melyek vállalnak domináns szerepet ezekben a folyamatokban, ugyanis a baktériumok nagy része ma még ismeretlen számunkra, így anyagcseréjük sem ismert. Ekkor lehet célszerű az anyagcsere folyamatokban kulcsszerepet betöltő funkciógének vizsgálata, kimutatása, hiszen így sokkal pontosabb képet kapunk arról, hogy milyen anyagcsere kapacitás van jelen a szennyezett területen. Az adott funkciógén bázisszortrendje, hasonlóan a 16S rRNS génjéhez, alkalmas lehet a faji azonosításra, így a későbbiekben pontosan meg lehetne mondani, hogy mely mikrobák vesznek részt aktívan a kérdéses anyag lebontásában. Éppen ezért vizsgálják előszeretettel például a kőolaj aromás komponenseinek lebontásában résztvevő funkciógéneket. A kérdéses gének azonban – például a katekol 1,2–dioxigenázok és a katekol 2,3-dioxigenázok - nagyfokú diverzitást mutatnak, emiatt PCR útján történő kimutatásuk gyakran nehézségekbe ütközik.

Munkám célja az volt, hogy e katekol dioxigenázok diverzitását kisebb taxonómiai csoportok esetén vizsgáljam, és olyan specifikus primereket, illetve monitorozásra alkalmas vizsgálati módszert tervezzek, amelyekkel e csoportokon belül nagy specifitással lehetünk képesek kimutatni a kérdéses géneket. Munkám során azt is vizsgáltam, hogy e funkciógének milyen taxonómiai információt hordoznak. E kérdéseket elsőként a *Rhodococcus* nemzetség esetében vizsgáltam, majd munkám második felében a Béta-Proteobaktériumoknak a BTEX-vegyületek lebontásában betöltött szerepe került vizsgálataim középpontjába.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A vizsgálataim során alkalmazott módszerek között megtalálhatóak mind a klasszikus tenyésztésen alapuló mikrobiológiai technikák, mind a modern, tenyésztéstől független molekuláris mikrobiológiai eljárások. Bár munkám során elsősorban az utóbbi módszerek kerültek előtérbe, a klasszikus mikrobiológiai módszerek elengedhetetlenül fontosak ahhoz,

hogy minél több olyan mikrobát ismerjünk meg, amelyek képesek a különböző xenobiotikumok lebontására, és hogy megismerjük e mikrobák anyagcsere képességeit.

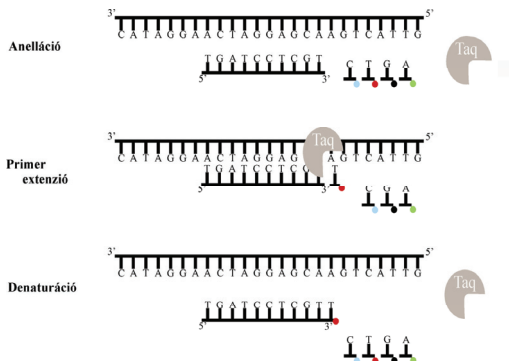
1. Az aromás szénhidrogének lebontására képes *Rhodococcus* törzsek vizsgálatakor az aromás gyűrű hasítását katalizáló catechol 1,2-dioxigenáz enzimet és az azt kódoló *catA* funkciógén kimutatását végeztük enzimaktivitás vizsgálattal, illetve PCR segítségével. Az enzimaktivitás vizsgálatot catechol szubsztrát alkalmazásával hajtottuk végre, és a szubsztrát lebontását spektrofotometriásan követtük. A funkciógén kimutatásához csoport specifikus primereket terveztünk. Ehhez a GenBank adatbázisból töltöttük le az akkor ismert *catA* gén szekvenciákat, majd a MEGA3 szoftver ClustalW algoritmusával segítségével illesztettük őket és homológ szakaszokat kerestünk a primer tervezéshez. A már korábban meglévő és az általunk újonnan kimutatott *Rhodococcus* eredetű *catA* géneket filogenetikai vizsgálatnak vetettük alá. A neighbour-joining módszer segítségével funkciógén alapú filogenetikai fát szerkesztettünk, amelyet ezután ugyanezen törzsek 16S rRNS gén alapján készült filogenetikai fájával hasonlítottunk össze.

2. Megismerve a vizsgált *Rhodococcus* törzsek *catA* génjének bázissorrendjét, illetve felismerve e génnek filogenetikai információ tartalmát, egy, a *catA* gén kimutatásán és tipizálásán alapuló eljárást fejlesztettünk ki a „single nucleotide primer extension” (SNuPE) módszer segítségével.

A SNuPE módszer azon alapszik, hogy a reakcióoldatban lejátszódó folyamat során a célszekvenciához hibridizálódott oligonukleotid csupán egyetlen nukleotiddal hosszabbodik meg, köszönhetően annak, hogy a reakcióelegyben jelen lévő összes szabad nukleotid dideoxinukleotid

(ddNTP) formájában van jelen. A szabad 3' OH-csoportok hiánya

miatt pedig a DNS polimeráz enzim nem tud újabb nukleotidot beépíteni a láncba. A reakcióelegyben jelen lévő négyféle dideoxinukleotid (A, T, G, C) különböző fluoreszcens jelölést hordoz, így kapilláris gélelektroforézis során, lézer indukálta fluoreszcens jel segítségével detektálni tudjuk az ily módon jelölődött oligonukleotidokat (1. kép). A beépült



1. kép. A SNuPE reakció folyamata.

ddNTP filogenetikai információt hordozhat, de ehhez persze elengedhetetlenül fontos, hogy az oligonukleotid próbánkat olyan célszekvenciára tervezzük, ahol a beépülő nukleotid jelenti az eltérést a különböző szekvencia variánsok között.

3. Munkám utolsó fázisában oxigénlimitált, kőolajszármazékokkal szennyezett talajvizekben vizsgáltam a Béta-Proteobaktériumoknak az aromás szénhidrogének lebontásában játszott szerepét. E vizsgálatok során specifikus primert terveztem a Comamonadaceae család fajai által kódolt katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) enzim génjének kimutatásához. A primertervezés a már előbbiekben ismertetett eljárás szerint történt. Hogy e gének diverzitását vizsgálni tudjuk, a közösségi DNS mintákból kapott PCR termékeket terminális fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálatnak vetettük alá. Annak érdekében, hogy a T-RFLP kromatogramokon kapott csúcsokat azonosítani tudjuk a PCR termékeket p-GemT Easy vektorba ligáltuk, ezt követően JM109 High Efficiency Competent *Escherichia coli* sejteket transzformáltunk az így készült vektorral és így módon funkciógén alapú klónkönyvtárakat hoztunk létre. A klónkönyvtárak feldolgozása során csoportosítottuk a klónokat azok molekuláris jellegzetességei alapján, majd megállapítottuk a csoportrepresentánsok bázissorrendjét. A vizsgált klónszekvenciákhoz legközelebb álló rokon C23O szekvenciák felhasználásával törzsfát szerkesztettünk a már említett módszerek segítségével annak érdekében, hogy megállapítsuk a klónszekvenciák pontos filogenetikai helyzetét. Továbbá megvizsgáltuk a mikroba közösségek faji összetételét, illetve a dominancia viszonyokat. Ehhez a mintákból izolált közösségi DNS-ből, *Bacteria* doménra specifikus primerek segítségével amplifikáltuk a 16S rRNS géneket, majd a már előbbiekben ismertetett eljárás szerint hoztunk létre klónkönyvtárakat és dolgoztuk fel azokat.

## AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI ÉS A KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *Rhodococcus* nemzetség tagjairól jól ismert, hogy számos xenobiotikum, így az aromás vegyületek lebontására is képesek, és gyakran izolálják őket különböző szénhidrogénekkel szennyezett talajokból, illetve talajvizekből. Munkánk során 11 különféle *Rhodococcus* törzs genomi DNS-ét felhasználva, saját tervezésű PCR primerek segítségével sikerült kimutatni a katekol 1,2-dioxigenáz (*catA*) gén jelenlétét. E gének filogenetikai elemzésével sikerült rámutatni, hogy a *Rhodococcus* nemzetség esetében a *catA* gén filogenetikai információt hordoz, és a rRNS génekhez hasonlóan filogenetikai marker génként használható. Mindez feltételezésünk szerint annak köszönhető, hogy a *Rhodococcusok* *catA*

génje esetében a horizontális géntranszfer ritka esemény. Mivel a *catA* gén fehérjét kódol, gyorsabban evolválódik, mint a riboszómális RNS géneket tartalmazó *rrna* operon, és így nagyobb taxonómiai felbontást eredményezhet e génnek filogenetikai elemzése. Emiatt pedig azoknak a közeli rokon *Rhodococcus* fajoknak az esetében, amelyek a 16S rRNS gén szekvenciája alapján nehezen különíthetők el, a *catA* gén szekvenciája segíthet az azonosításban.

2. Mivel a *Rhodococcus*ok *catA* génje filogenetikai információt hordozó funkciógén, markergénként szolgálhat például *Rhodococcus* törzsekkel végzett bioaugmentációs eljárások során. E gént, illetve az erről a génről átíródó mRNS-t kimutatva ugyanis nem csak abban lehetünk biztosak, hogy e baktériumok jelen vannak például aromás szénhidrogénekkal szennyezett földtani közeg mikrobiális közösségében, hanem arról is információt kaphatunk, hogy ténylegesen részt vesznek-e a szennyezőanyag lebontásában. Egy ilyen monitoring rendszer működtetéséhez azonban gyors és megbízható molekuláris módszerek szükségesek. Még ma is sok esetben próbálkoznak a bioaugmentációs kezelés alatt álló területről származó mintákból tenyésztéssel kimutatni a területre kijuttatott mikrobák jelenlétét, ez azonban csak ritkán hoz megbízható eredményt. A molekuláris módszereken alapuló közösségvizsgáló eljárások pedig, mint például a DGGE, a klónozás vagy a T-RFLP pedig laborintenzív, anyag és időigényes módszerek. Erre a problémára nyújthat megoldást a single nucleotide primer extension (SNuPE) módszer használata. E módszer segítségével olyan eljárást dolgoztunk ki, amellyel lehetőség nyílik arra, hogy a *catA* gén alapján detektáljuk és tipizáljuk a különböző *Rhodococcus* törzseket. Alkalmas lehet arra, hogy bioaugmentációs eljárás során alkalmazott *Rhodococcus* törzseket gyorsan és nagy biztonsággal tudjuk kimutatni a szennyezett közeg mikrobiotájából, és ezáltal monitorozni a kívánt anyagcsere aktivitást. Emellett arra is alkalmas lehet, hogy aromás szénhidrogénekkal szennyezett talaj, illetve talajvíz mikroba közösségének elemzésekor megvizsgáljuk azt, hogy a közösségben jelen vannak-e olyan *Rhodococcus* törzsek, amelyek képesek a szennyezőanyag lebontására.

3. A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó baktériumok *catA* génjének vizsgálata során szerzett tapasztalatainkat felhasználva kezdtük el a Béta-Proteobaktériumok, illetve e csoporton belül is elsősorban a Comamonadaceae családba tartozó baktériumok által kódolt katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) gének, illetve enzimek elemzését. E gének azért érdekesek, mert amellett, hogy hatalmas diverzitással rendelkeznek, az általuk által kódolt enzimek, amelyek az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartoznak, olyan enzimkinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, aminek következtében működésük szempontjából előnyös számukra a hipoxikus környezet. Talajok és talajvizek kőolajszármazékokkal történő

szennyezésekor szokásos *in situ* bioremediációs eljárás a szennyezett közeg levegőztetése, és ezáltal az aerob viszonyok biztosítása a szennyezőanyag eltávolításában résztvevő aerob mikrobák számára. Sok esetben azonban a szennyezés mind horizontálisan, mind pedig vertikálisan nagy területre terjed ki, és ilyen esetekben nehéz a teljes földtani közegben biztosítani az aerob viszonyokat, így az oldott oxigén koncentrációja kicsi maradhat például a mélyebben fekvő rétegekben. Emiatt fontos megismerni azoknak a mikrobáknak, illetve az általuk kódolt C23O géneknek a diverzitását, amelyek nagy szerepet játszhatnak az aromás szénhidrogének lebontásában oxigénlimitált körülmények között. Két olyan, aromás szénhidrogénnel szennyezett területen vizsgáltuk e gének, és az őket kódoló mikrobák diverzitását, ahol a talajvízben hipoxikus körülmények uralkodtak. Mindkét talajvízben a Béta-Proteobaktériumok dominanciája volt kimutatható, és szinte kizárólag olyan C23O géneket sikerült kimutatni, amelyek az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó C23O enzimeket kódolnak. Ez az eredmény megerősíteni látszik azt a feltevésünket, hogy hipoxikus körülmények között nagy szerepet játszhatnak az aromás szénhidrogének lebontásában azok a mikrobák, amelyek ilyen C23O génekkel rendelkeznek, és e mikrobák elsősorban a Béta-Proteobaktériumok közé tartoznak.

## A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

**Táncsics A.**, S. Szoboszlai, B. Kriszt, J. Kukolya, E. Baka, K. Márialigeti, S. Révész (2008) Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *J Appl Microbiol*, **105**(4), 1026-1033.

Nikolausz M., A. Chatzinotas, **A. Táncsics**, G. Imfeld, M. Kästner (2009) Evaluation of single-nucleotide primer extension for detection and typing of phylogenetic markers used for the investigation of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 2850-2860.

Nikolausz M., A. Chatzinotas, **A. Táncsics**, G. Imfeld, M. Kästner (2009) The single-nucleotide primer extension (SNuPE) method for the multiplex detection of various DNA sequences: from detection of point mutation to microbial ecology. *Biochem Soc Trans*, **37** (Pt 2), 454-9.